

学校编号：10384

分类号____密级

学号：200127011

UDC

学 位 论 文

小球藻多糖的提取纯化及其初步 结构分析

Extraction and Purification and Primary Structure Analysis
of Polysaccharides from *Chlorella sp.*

吴 曼

指导老师姓名：李文权 教授

申请学位级别：硕士

专 业 名 称：海洋化学

论文提交日期：2004 年 6 月

论文答辩日期：2004 年 6 月

学位授予单位：厦 门 大 学

学位授予日期：

答辩委员会主席：耿安朝 教授

评 阅 人：陈立奇 研究员

陈绍勇 研究员

2004 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文,是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果,均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人(签名): 吴曼

年 月 日

目 录

中文摘要	1
第一章 引言	1
1.1 海洋生物活性多糖研究进展	2
1.1.1 海洋生物多糖的活性	3
1.1.2 多糖构效关系研究进展	3
1.1.2.1 主链性质与生物活性的关系	4
1.1.2.2 支链性质与生物活性的关系	6
1.1.2.3 高级结构和多糖活性的关系	7
1.1.2.4 分子量与活性的关系	7
1.1.2.5 其它理化性质与活性的关系	8
1.2 海洋生物多糖研究方法概述	8
1.2.1 多糖的分离提取和纯化	8
1.2.2 多糖的结构分析	9
1.3 海藻多糖	10
1.4 本研究的意义	12
第二章 研究方法 with 实验材料	14
2.1 小球藻培养	14
2.1.1 藻种来源	14
2.1.2 小球藻培养	14
2.1.3 小球藻粉制备	14
2.2 多糖的定量测定	15
2.3 小球藻多糖的提取	16
2.4 小球藻粗多糖除蛋白	17

2.4.1 TCA1 法除蛋白.....	18
2.4.2 TCA2 法除蛋白.....	18
2.4.3 酶法除蛋白.....	18
2.5 小球藻粗多糖的纯化.....	18
2.5.1 Sephadex-G 100 柱层析.....	19
2.5.2 Sephadex-G 200 柱层析.....	20
2.5.3 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析.....	20
2.6 多糖中单糖组成的气相色谱分析.....	20
2.6.1 多糖的水解、还原及乙酰化.....	21
2.6.2 标准单糖的还原和乙酰化.....	22
2.6.3 糖类气相色谱分析条件.....	22
2.6.4 定性和定量方法.....	23
2.7 多糖的红外光谱分析.....	24
2.8 多糖中硫酸基含量的测定.....	26
2.9 主要的实验试剂与仪器设备.....	27
2.9.1 主要的实验试剂.....	27
2.9.2 试验仪器设备.....	28

第三章 小球藻粗多糖的纯化方法研究.....30

3.1 粗多糖除蛋白方法的研究.....	30
3.1.1 不同除蛋白方法多糖得率的比较.....	30
3.1.2 不同除蛋白法所得粗多糖的红外光谱分析.....	31
3.2 不同层析介质对小球藻多糖的纯化效果比较.....	33
3.2.1 Sephadex-G100 柱层析.....	33
3.2.2 Sephadex-G 200 柱层析.....	34
3.2.3 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析.....	35

3.2.4 三种层析介质的比较.....	35
3.3 小结.....	36
第四章 不同提取介质下的小球藻多糖.....	37
4.1 碱提小球藻多糖.....	37
4.2 水提小球藻多糖.....	42
4.3 酸提小球藻多糖.....	46
4.4 碱提、水提和酸提多糖的比较.....	50
4.4.1 提取率的比较.....	50
4.4.2 化学组成比较.....	52
4.4.3 化学结构比较.....	54
4.5 小球藻多糖生物活性预测.....	55
4.6 小结.....	56
第五章 结语.....	57
5.1 本研究的结论.....	58
5.2 本研究的创新点.....	59
5.3 本研究的不足之处.....	59
5.4 研究展望.....	59
参考文献.....	61
英文摘要.....	73
发表的论文.....	75
致谢.....	76

Contents

Abstract.....	1
Chapter1 Introduction.....	1
1.1 Research Progress of Biologically Active Polysaccharides in Marine Liver.....	2
1.1.1 Biological Activity of Polysaccharide in Marine Liver...	3
1.1.2 Relationship Between Structure and Activity of Polysaccharide.....	3
1.2 Review of Research method of polysaccharides in Marine Liver	8
1.2.1 Extraction and Purification of Polysaccharides	8
1.2.2 Structure Analysis of Polysaccharides.....	9
1.3 Polysaccharides of Marine Alga	10
1.4 Significance of this Research.....	12
Chapter 2 Research Method and Experimental material ...	14
2.1 Culture of Chlorella sp.	14
2.1.1 Source of Alga.....	14
2.1.2 Culture of Chlorella sp.	14
2.1.3 Preparation of Alga powder.....	14
2.2 Quantitative Analysis of Polysaccharide.....	15
2.3 Extraction of Polysaccharide from Chlorella sp.	16
2.4 Removing Protein from Crude Polysaccharide.....	17

2.4.1 Removing Protein by Means of TCA1.....	18
2.4.2 Removing Protein by Means of TCA2.....	18
2.4.3 Removing Protein by Means of Enzyme.....	18
2.5 Purification of Crude Polysaccharide.....	18
2.5.1 Column Chromatography with Sephadex-G 100.....	19
2.5.2 Column Chromatography with Sephadex-G 200.....	20
2.5.3 Column Chromatography with DEAE Sepharose Fast Flow.....	20
2.6 GC Analysis of Polysaccharide.....	20
2.6.1 Hydrolysis , Deoxidization and Acetylating of Polysaccharides.....	21
2.6.2 Deoxidization and Acetylating of Standard Saccharides...	22
2.6.3 Conditions of GC Analysis of Polysaccharide.....	22
2.6.4 qualitative and quantitative method.....	23
2.7 FT-IR Analysis of Polysaccharide.....	24
2.8 Quantitative Analysis of Sulphate.....	26
2.9 Main Experimental Reagents and Instruments.....	27
2.9.1 Main Experimental Reagents.....	27
2.9.2 Main Experimental Instruments.....	28
Chapter 3 the Research of Purification Method of Polysaccharides.....	30
3.1 The Research of Removing Protein Method.....	31
3.1.1 Comparing of Recovery Ratio of Polysaccharides Obtained by Different Removing Protein Methods.....	30
3.1.2 FT-IR Analysis of Crude Polysaccharide Obtained by	

Different Removing Protein Methode.....	31
3.2 Comparing of Purification with Different Column Chromatography Mediums.....	33
3.2.1 Column Chromatography with Sephadex-G 100.....	33
3.2.2 Column Chromatography with Sephadex-G 200.....	34
3.2.3 Column Chromatography with DEAE Sepharose Fast Flow....	35
3.2.4 Comparing of Three Chromatography Mediums.....	35
3.3 Summary.....	36
Chapter 4 Polysaccharides of Chlorella sp. Extracted by Different Mediums.....	37
4.1 Polysaccharides Extracted by 4% NaOH.....	37
4.2 Polysaccharides Extracted by distilled water.....	42
4.3 Polysaccharides Extracted by 0.01M HCl	46
4.4 Comparing of Polysaccharides Extracted by Different Medium	50
4.4.1 Comparing of Extraction radio.....	50
4.4.2 Comparing of Constituent Saccharides.....	52
4.4.3 Comparing of Structure.....	54
4.5 Forecast of Biological Activity of Polysaccharides from Chlorella sp.	55
4.6 Summary.....	56
Chapter 5 Summary.....	57
5.1 Results of the Research.....	57
5.2 Innovation of the Research.....	59

5.3 Deficiency in the Research.....	59
5.4 Prospect of the Research.....	59
Reference.....	61
Abstract.....	73
Papers Published.....	75
Acknowledgement.....	76

摘 要

小球藻对温度、盐度适应能力广，繁殖快，目前已有大规模养殖，作为保健食品、饲料、化妆品等原料被大量应用，然而对其多糖的研究极少，本文以实验室培养（海水为培养基）的小球藻（*Chlorella* sp.）为研究对象，研究了其提取纯化的工艺条件，建立了高效、快速的小球藻多糖提取方法，并采用气相色谱和红外光谱分析方法初步研究了小球藻多糖的结构。

两种除蛋白方法比较结果表明，采用先乙醇沉淀，离心分离沉淀再用 3%TCA 除蛋白的方法（即 TCA2 法）比直接在粗提液中加入 5%TCA 除蛋白的方法（即 TCA1 法）多糖得率更高，并可大大节省乙醇和 TCA 的用量，TCA 法和对照组酶法除蛋白所得多糖的红外色谱图表明，TCA 并未明显破坏多糖结构。粗多糖试用三种层析介质（Sephadex-G 100、Sephadex-G 200 和 DEAE Sepharose F.F.）纯化，结果表明 DEAE Sepharose F.F. 更适合小球藻多糖的纯化，具有载量高、柱性能稳定、流速快等优点。

三种提取介质（4%NaOH、水和 0.01MHCl）提取小球藻多糖，TCA2 法除蛋白，DEAE Sepharose Fast Flow 纯化后均得到两种精多糖，前一种均为主要由葡萄糖组成的中性多糖，后一种均为由岩藻糖、葡萄糖和半乳糖组成的硫酸酯化杂多糖，红外光谱显示结构稍有不同，硫酸基的含量变化不大，在 10.14 ~ 13.94% 之间。碱提多糖的提取率和硫酸多糖得率最高，水提多糖的提取率最低，酸提多糖中硫酸多糖的比例偏低。因此 4%NaOH 溶液为最佳提取介质。

小球藻多糖最佳提取纯化流程为：先超声破碎协同 4%NaOH 80 提取 1h，TCA2 法除蛋白，然后再经 DEAE Sepharose F.F. 柱层析即得精多糖。

小球藻多糖初步结构分析结果，结合文献中多糖的构效关系分析表明该多糖可能具有多种生物活性，极具开发潜力。

关键词：小球藻；多糖；提取

第一章 引言

海洋，占据地球表面的 71%，拥有 13.7 亿立方千米的海水，使人类赖以生存的地球成为太阳系中唯一的一颗蔚蓝色的水球。近二三百年以来，人类在地球上创造了空前辉煌的文明，但也因此消耗了大量的陆地资源。现在看来有限的陆地资源已远远满足不了人类越来越高的需求了。为了找到更多的资源，为了把地球建成美好的家园，人们又把目光投向了蔚蓝色的海洋。近年来，伴随着人类向海洋进军的步伐，以开发海洋药物资源为标志的“蓝色革命”正在全世界范围内兴起，海洋生物资源产业发展迅猛，海洋药物产业已成为海洋经济的一个重要组成部分。专家预言，21 世纪将是海洋的世纪，将是人类运用海洋生物工程技术，进行研究和开发利用海洋生物资源的黄金时代^[1]。

海洋中生物种类繁多，数量巨大。现在记录在册的海洋生物多达 20 万种，其中海洋动物约 18 万种，海洋植物约 6500 种，海洋真菌约 500 种，海洋原生生物约 12000 种，海洋生物总质量达 342 亿吨，其中浮游动物 215 亿吨，底栖动物 100 亿吨，游泳动物 10 亿吨，海洋植物 17 亿吨^[2]。海洋中生活着如此大量的生物，加之海洋生态环境的复杂性和特殊性——高盐度、高压、低温和特殊的光照，因此海洋生物中存在着大量的种类繁多的生物活性物质。过去几十年，已在海洋中发现了 10000 多种新的生物活性物质^[3]，其中有重要生物活性并已申请专利的有 200 多种^[3,4]，并有相当数量的活性物质正在进行药品开发。从 1990 年开始大部分发现的生物活性物质来自于海洋生物而非陆地生物，可以说海洋是人类未来药物原料的宝库^[1]。

1.1 海洋生物活性多糖研究进展

海洋生物体内存在大量多糖类物质。由于生长环境不同, 这些多糖类物质不同于陆地生物来源多糖, 例如硫酸酯化多糖就是海洋生物多糖所特有的。随着人们对海洋生物多糖研究的深入, 发现许多海洋生物体内存在具有多种生物活性的多糖。所以近年来, 海洋生物活性多糖的研究开发已成为一个热门领域^[5]。

现代海洋药物的研究始于二十世纪 60 年代, 尽管人类研究海洋生物多糖的历史并不长, 但是已取得较大进展。自海藻中分离得到的琼胶、卡拉胶、褐藻胶以及来源于海洋动物的甲壳质均有大批量的工业生产, 广泛应用于医药、食品、生化等工业^[6]。从紫菜中提取的一种分子量约为 74,000 的多糖能促进蛋白质生物合成, 提高机体免疫功能, 抗肿瘤、抗突变、抗肝炎、抗白细胞减少、降血脂、降血糖、抑制血栓的形成^[7,8]。褐藻多糖硫酸酯 (FPS) 是褐藻特有的一种水溶性多糖, 具有抗凝血、降血脂、防止血栓形成、改善微循环、解毒、抗肿瘤、抗 HIV 等功能, 临床用于慢性肾炎的治疗^[7,9]。刺参多糖含氨基己糖、己糖醛酸、岩藻糖和硫酸酯, 可以抑制肿瘤生长, 对心脑血管栓塞等疾病有很好疗效^[7]。日本上市的抗肿瘤药物 Marinactin 是一株黄杆菌属 (Flavobacterium) 海洋细菌产生的胞外多糖, 是由果糖、甘露糖和葡萄糖构成的杂多糖^[7,10]。其他还有鲍鱼多糖、海星多糖、扇贝多糖等多种海洋生物活性多糖正在被研究。近几年国内已有多种海洋多糖类药物获国家批准上市: 如褐藻酸双酯钠 (Polysaccharide Sulfate, PSS) 是在褐藻酸钠分子的羟基及羧基上分别引入磺酰基及丙二醇基所形成的双酯钠盐, 用于高酯白血症, 对缺血性脑、心血管疾病有一定疗效, 有明显的抗凝、解聚、降压、降酯、降低血粘度及扩张血管改善微循环的作用^[11]; 从海洋生物中提取并经降解、分级、纯化, 再经化学修饰而制得的一种低分子量的硫酸多糖类药物“989”, 是根据近年来抗脑缺血药

物研究开发的现状及市场需求得到的启示,特别是通过对硫酸多糖类药物药理作用和构效关系研究结论的分析研制的一种新型海洋药物^[12]; 国家类抗艾滋病新药聚甘古酯(911),是从海藻中提取,经化学修饰而得到的一种海洋硫酸多糖类物质,可以通过免疫调节和抑制病毒复制等多种途径发挥抗艾滋病作用。有疗效确切、副作用小等优点,现已进入二期临床研究阶段^[13, 14]。

2003 年我国第一个海洋糖库在中国海洋大学建成,是我国首次建立的集海洋寡糖制备、分离、纯化、修饰、分析、鉴定为一体的技术体系。该课题以海洋多糖为基础原料,采用生物和化学降解等方法,已制备出纯度高、结构明确的海洋寡糖单体化合物 50 个;以此糖类化合物为基础原料,获得糖缀合物 60 个,其中分别有 28 个和 49 个为世界首次报道,将为现代海洋糖类药物的筛选和发现、现代海洋中药研制以及生命科学相关基础研究提供物质基础和资料^[15]。

1.1.1 海洋生物多糖的活性

从目前所研究的海洋生物多糖看,其活性主要集中在以下几个方面^[5, 7, 16] :

- (1) 整肠和解毒作用;
- (2) 降血脂、降血糖作用;
- (3) 增强机体免疫能力;
- (4) 抗炎、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、抗辐射;
- (5) 抗病毒(尤其 HIV 病毒)、抗白细胞减少;
- (6) 抗凝血、抑制血栓形成等。

1.1.2 多糖构效关系研究进展

多糖是由多个单糖通过糖苷键连接而成的大分子,一般含有 10 个以上单糖单位的分子称之为多糖。由于单糖中存在手性碳原子,因此有构型不同的立体异构体,根据单糖末端羟基位置的不同,单糖分为 D-和 L-构型,离分子中羰基最远的手性碳原子的构型与 D-甘油醛构型相同的单糖构型为 D 型,反之,则属 L 型。游离的糖和糖衍生物主要以稳定的环状结构存在,单糖通过一个环状半缩醛形成环状结构,半缩醛羟基可以有两种不同取向,于是产生 α 、 β 两种异构体。单糖与单糖之间通过糖苷键连接形成多糖时,单糖中不同碳原子相连,形成多种连接方式,如 1-3 连接、1-4 连接等。每一个单糖可以与不止一个单糖通过糖苷键连接,形成支链。单糖之间还可以有不同的连接顺序,因此多糖的结构较为复杂。

多糖的结构是影响其活性的重要因素。多糖结构一般分为四级,其中一级结构包括主链性质(糖单元的组成、连接顺序及连接方式)和支链性质(有无分支及分支类型、位置、长短);二级结构指多糖主链间以氢键为主要次级键而形成的有规则的构像;以二级结构为基础,由于糖单位间的非共价键相互作用而导致有序且粗大的构像,即为多糖的三、四级结构。多糖的一级结构又称为初级结构,二、三、四级结构则称为高级结构,两者均直接决定多糖的生物学活性^[17]。功能以结构为基础,构效关系的研究为活性多糖的目的性筛选、进行分子修饰提供理论指导。

1.1.2.1 主链性质与生物活性的关系

主链糖单元的组成决定了多糖的种类,不同种类的多糖,其生物学活性存在较大差异。主链的重复糖单元相同的多糖称为同多糖;由两种或两种以上的单糖连接构成主链的多糖称为杂多糖。葡萄糖是自然界许多动植物和微生物多糖的基本结构单元,据推测,它可能是生物产生宿主防御机制的基本诱发基因^[17,18]。目前得到的许多活性多糖,如香菇多糖、裂褶多糖、灰

树花多糖、猪苓菌多糖等均为具有葡聚糖主链结构的真菌多糖。有些果聚糖也具有生物活性,如从高等植物一枝黄花(*Solidago virgaurea*)提取的果聚糖也具有抗肿瘤作用^[19,20]。从酵母细胞壁中得到的甘露多糖能抑制人体细胞突变和抗氧化的活性^[23]。另外也有很多具有生物学活性的杂多糖,如以半乳糖葡萄糖为主链的杂多糖 Thamnoan 具有突出的免疫调节功能和抗肿瘤活性^[24],由木糖、阿拉伯糖和半乳糖组成的箬竹多糖可促进巨噬细胞产生肿瘤坏死因子^[25]。硫酸化均多糖比硫酸化杂多糖有更强的活性,如岩藻依聚糖和葡聚糖等均聚多糖的硫酸酯化比肝素等杂多糖硫酸酯化有更强的抗 HIV - 、抗人类 T 淋巴细胞病毒 型的活性^[26]。关于多糖的类型与活性的一般规律还有待进一步深入研究。

多糖主链上组成单糖的糖环构型与多糖的生物活性也有密切关系, Yoshi da 等认为硫酸呋喃戊聚糖比硫酸吡喃戊聚糖具有更高的活性,这可能是呋喃环具有更大的弹性所致^[27]。

多糖主链的半缩醛羟基构型在多糖活性中也起重要作用。对于葡聚糖而言, α -葡聚糖一般没有活性,主要是因为人体内存在 α -葡萄糖苷酶,能使 α -糖苷键发生水解。尽管也有 α -葡聚糖增强人体免疫能力和产生抗肿瘤活性的报道^[28],但这些研究还停留在实验室实验阶段,未进入临床实验,只有那些在人体内不被 α -葡萄糖苷酶降解的 β -葡聚糖才有可能成为多糖药物。对于其他类型的多糖,具有生物学活性者也多是 β - 构型, α -构型与多糖生物学活性的具体作用机制仍不详^[18]。

多糖主链上相邻糖基的连接方式(即糖苷键的类型)也是决定多糖活性的重要因素。研究表明,多数具有突出生物学活性的葡聚多糖都以(1,3)糖苷键连接,具有抗肿瘤活性的甘露多糖为(1,6)键型;活性半乳多糖则以(1,3)键型连接^[18]。

1.1.2.2 支链性质与生物活性的关系

可作为多糖支链的基团包括某些阴离子基团、各种糖基和一些烷基等。多糖支链种类、位置、长短及分支度(degree of branch, DB)都对多糖的生物活性有重要的影响。Groth^[29]等人比较了相同取代条件下硫酸化纤维素和磷酸化纤维素的抗凝血活性, 后者的最低抗凝血质量浓度为 25mg/ml, 是硫酸化纤维素的 100 倍, 若以四元胺基取代硫酸化纤维素中的硫酸基, 则其原有的抗凝血活性全部消失, 说明虽然同为带负电荷的取代基, 其产生生物学活性的机理不同, 硫酸取代基可增加多糖的活性。同时 Yoshi da^[30]研究还指出主链或支链上氨基糖比例越高, 硫酸多糖的抗 HIV-1 活性越高。即使同为糖基作支链, 糖基的类型不同, 对多糖活性的影响也不同, Yoshi da 等人比较了 6 种硫酸化凝结多糖衍生物的抗 HIV 活性, 结果显示, 以阿拉伯低聚糖和半乳糖为支链的硫酸化凝结多糖衍生物的抗 HIV 活性显著, 其余衍生物的抗 HIV 活性不明显^[31]。Gao 等人报道, 硫酸化凝结多糖不论硫酸取代基的分布如何, 当 DB < 1.3 时, EC₅₀ (μg/mL) 明显增大, 抗 HIV 活性明显降低^[32]; Groth 等人报道硫酸化纤维素产生抗凝血活性的最低 DB 为 1.0^[29]。也并不是 DB 越高, 活性越强, 以硫酸基取代葡萄糖基后的硫酸葡聚糖, 其产生抗病毒活性的最佳 DB 为 1.5 左右。De Clercq(1989)认为要获得最佳抗 HIV-活性, 每个糖单位含 2~3 个硫酸基是必须的^[18]。

支链的位置也影响分支多糖的活性。硫酸化多糖 Dermatan sul fate 的抗凝血活性受硫酸取代基位置的影响, 在保持硫酸基取代度不变的情况下, 将 C₄ 位上的硫酸基变为 C₆ 位硫酸基, 则其抗凝血活性完全丧失^[33]; Gohdes^[34]等人指出, 纤维素只有主链葡萄糖单元的 C₂ 和 C₃ 位发生硫酸基取代才能产生生物学活性, 而 C₆ 位的取代无助于其活性; Groth^[29]也指出, 纤维素的 C₆ 位即使发生完全硫酸化取代, 也只能产生微弱的抗凝血活性。但 Gao^[32]等人的研究结果不同, 以具有 β-(1,3) -D-葡聚糖主链的凝结多糖为对象, 通过硫

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库